

БИМИНЕРАЛИЗАЦИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА В ЦЕОЛИТОПОДОБНЫЙ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИЙ КАРКАСНЫЙ ПОЛИМЕР ZIF-8

DOI: 10.17691/stm2024.16.1.01

УДК 577.212:546.1

Поступила 14.08.2023 г.

© **И.Х. Шайхутдинов**, к.фарм.н., научный сотрудник лаборатории новых медицинских материалов и технологий Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий; ассистент кафедры химии Института фармации;
П.В. Ильясов, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории неинфекционной иммунологии Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий;
Л.В. Лимарева, д.б.н., доцент, зав. лабораторией неинфекционной иммунологии Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий;
А.С. Сустретов, зав. лабораторией метагеномики человека Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий;
Д.А. Кокорев, специалист лаборатории метагеномики человека Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий;
А.В. Соколов, к.х.н., зав. лабораторией новых медицинских материалов и технологий Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий

Самарский государственный медицинский университет, ул. Чапаевская, 89, Самара, 443099

Цель исследования — оценить возможности биоминерализации геномной ДНК человека в металлоорганический каркасный полимер (МОКП) ZIF-8 и сохранения включенной последовательности ДНК после цикла инкапсуляции и растворения композита. Данное исследование является начальным этапом разработки абиотического вектора для работы с нативными нуклеиновыми кислотами произвольного размера на основе композита ДНК@ZIF-8.

Материалы и методы. Объектом исследования послужила геномная ДНК человека, выделенная из лимфоцитов периферической крови здоровых добровольцев, с использованием набора «Проба-НК» (НПО «ДНК-Технология», Россия). Оценка чистоты и концентрации геномной ДНК проводили спектрофотометрически при длинах волн 260/280 нм на планшет-ридере Tecan Infinity 200 Pro (Tecan Instruments, Австрия). Синтез ZIF-8 выполняли в физиологических условиях (37°C) путем смешивания водных растворов солей цинка с 2-метилимидазолом при различных мольных соотношениях. В аналогичных условиях была проведена биоминерализация геномной ДНК человека в ZIF-8. Полученный МОКП и композит ДНК@ZIF-8 исследовали методом порошковой рентгеновской дифрактометрии на дифрактометре Phaser D2 (Bruker, США), удельную площадь поверхности оценивали на порозиметре Autosorb iQ (Quantachrome, США). Для количественной оценки инкапсулированной ДНК композит ДНК@ZIF-8 растворяли в цитратном буфере. Сохранность ДНК определяли методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени (АС-ПЦР) с использованием наборов для исследования однонуклеотидных полиморфизмов (НПФ «Литех», Россия) на амплификаторе Quantstudio 6 Pro (Thermo Scientific, США). В случае использования наборов с электрофоретической детекцией амплификацию проводили на термоциклере T100 (Thermo Scientific, США).

Результаты. Получены полимер ZIF-8 и композит ДНК@ZIF-8 при различных мольных соотношениях ионов цинка с 2-метилимидазолом, охарактеризована их структура и удельная площадь поверхности. Определена эффективность биоминерализации геномной ДНК, которая составила порядка 7–8%. ПЦР-анализ биоминерализованной ДНК показал сохранность неселективно выбранных локусов.

Заключение. В результате исследований подтверждена возможность инкапсуляции геномной ДНК в металлоорганический каркасный полимер ZIF-8. ДНК после биоминерализации сохраняет пригодность для использования в исследованиях по формированию и изучению генетических конструкций.

Для контактов: Шайхутдинов Ильнур Хясяинович, e-mail: i.h.shajhutdinov@samsmu.ru

Ключевые слова: биоминерализация; инкапсуляция; металлоорганические каркасные полимеры; геномная ДНК человека; генетические векторы; полимер ZIF-8.

Как цитировать: Shaykhutdinov I.H., Iliasov P.V., Limareva L.V., Sustretov A.S., Kokorev D.A., Sokolov A.V. Biomineralization of human genomic DNA into ZIF-8, a zeolite-like metal-organic framework. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(1): 5, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.1.01>

English

Biomineralization of Human Genomic DNA into ZIF-8, a Zeolite-Like Metal-Organic Framework

I.H. Shaykhutdinov, PhD, Researcher, Laboratory of New Medical Materials and Technologies, Professional Center for Education and Research in Genetic and Laboratory Technologies; Assistant, Chemistry Department, Pharmacy Institute;

P.V. Iliasov, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Non-Infectious Immunology, Professional Center for Education and Research in Genetic and Laboratory Technologies;

L.V. Limareva, DSc, Associate Professor, Head of the Laboratory of Non-Infectious Immunology, Professional Center for Education and Research in Genetic and Laboratory Technologies;

A.S. Sustretov, Head of the Laboratory of Human Metagenomics, Professional Center for Education and Research in Genetic and Laboratory Technologies;

D.A. Kokorev, Specialist, Laboratory of Human Metagenomics, Professional Center for Education and Research in Genetic and Laboratory Technologies;

A.V. Sokolov, PhD, Head of the Laboratory of New Medical Materials and Technologies, Professional Center for Education and Research in Genetic and Laboratory Technologies

Samara State Medical University, 89 Chapaevskaya St., Samara, 443099, Russia

The aim of the study was to assess the capabilities of human genomic DNA biomineralization into ZIF-8 metal-organic framework (MOF) preserving DNA sequence integrity after the encapsulation cycle and composite dissolving. The study is an initial stage of the project aimed at developing an abiotic vector to be used when working with native nucleic acids of an arbitrary size based on DNA@ZIF-8 composite.

Materials and Methods. We studied human genomic DNA isolated from lymphocytes of peripheral blood of healthy volunteers using Proba-NK kit (DNA-Technology LLC, Russia). Genomic DNA purity and concentration was estimated spectrophotometrically at 260/280 nm using Tecan Infinity 200 Pro plate reader (Tecan Instruments, Austria). ZIF-8 was synthesized in the physiological conditions (37°C) by mixing zinc salt and 2-methylimidazole aqueous solutions at different molar ratios. Human genomic DNA was encapsulated into ZIF-8 in similar conditions. The obtained MOF and DNA@ZIF-8 composite were studied using X-ray powder diffraction at the Phaser D2 XRPD device (Bruker, USA), and the specific surface area was estimated using Autosorb iQ porosimetry analyzer (Quantachrome, USA). The encapsulated DNA was quantified by dissolving DNA@ZIF-8 composite in the citrate buffer. DNA integrity was assessed by real-time allele-specific PCR (AS-PCR) using the kits for single nucleotide polymorphisms (Lytech, Russia) at the Quantstudio 6 Pro PCR machine (Thermo Scientific, USA). In case of using the kits with electrophoretic detection, the amplification was performed on the thermal cycler T100 (Thermo Scientific, USA).

Results. The polymer ZIF-8 and DNA@ZIF-8 composite were obtained at different molar ratios of zinc ions and 2-methylimidazole. We characterized their structure and specific surface area. Genomic DNA biomineralization efficacy was found to be about 7–8%. PCR indicated the integrity of non-selectively chosen loci within the biomineralized DNA.

Conclusion. The study confirmed the possibility of human genomic DNA encapsulation into ZIF-8 metal-organic framework. After the biomineralization, DNA was found to preserve feasibility to be used in studies to investigate genetic constructs.

Key words: biomineralization; encapsulation; metal-organic framework; human genomic DNA; genetic vectors; ZIF-8.

Введение

Одной из важнейших прикладных областей в геномной инженерии и терапии является создание систем для доставки генетического материала в клетку [1]. В качестве таких систем доставки применяют как биотические, так и абиотические векторы. Биотические векторные системы, к которым относятся, в частности,

вирусные и плазмидные векторы, используются наиболее часто [2–8]. Они легко проникают через биологические барьеры, способны осуществлять эффективную трансфекцию и индукцию долговременной экспрессии генов. Вместе с тем у вирусных векторов существуют и серьезные недостатки, такие как ограниченный объем полезной нагрузки, риск канцерогенеза, иммуногенность, токсичность [9].

К абиотическим векторным системам относят полимерные [10], липидные [11, 12], магнитные [13] наночастицы и наночастицы на основе золота [12]. Такие системы доставки обладают рядом важных преимуществ, в частности возможностью загрузки компонентов большого размера, простотой формирования, пониженной токсичностью, минимальным иммунным ответом [14–16]. Кроме того, технологии производства невирусных векторных систем легко масштабируются [17]. В то же время абиотические векторы характеризуются и недостатками, ограничивающими их применение. Так, многие биоразлагаемые полимеры отличаются низкой стабильностью *in vivo*: например, липосомы склонны к спонтанной агрегации, что требует введения в их структуру стабилизирующих агентов [18]. В общем случае инкапсуляция высокомолекулярных биологических полимеров (белки, нуклеиновые кислоты) с помощью полимерных и мицеллярных носителей сопряжена с практическими затруднениями по причине низкой эффективности загрузки [19], а также значительной сложности преодоления вне- и внутриклеточных мембран и сохранения функциональной целостности инкапсулированных биологических соединений [20].

В последнее время появились публикации, посвященные применению в качестве абиогенных генетических векторов металлоорганических каркасных полимеров (МОКП). Показано [21], что клетки млекопитающих могут подвергать эти полимеры эндоцитозу, что облегчает введение инкапсулированной или минерализованной полезной нагрузки в клетки-мишени и устраняет необходимость использования специализированных процедур трансформации. МОКП химически и термически стабильны, их можно формировать в биосовместимых условиях. Еще одним фактором, облегчающим адресную доставку полезной нагрузки, является способность МОКП защищать генетический материал от деградации в физиологических условиях и обеспечивать его контролируемое высвобождение [22]. Так, широко используемый для иммобилизации биокомпонентов цеолитоподобный имидазолатный МОКП ZIF-8 на основе цинка показал эффективность для биоминерализации белков [23, 24], углеводов [25–28], вирусов [29] и клеток [30, 31], а также плазмидной ДНК, микроРНК [32, 33], нуклеопротеинов и компонентов систем редактирования генома [34–37]. Однако работы, описывающие включение (геномной) ДНК в ZIF-8 и его аналоги, на данный момент отсутствуют. Примечательно, что кроме высокой несущей способности ZIF-8 отличается возможностью распадаться при кислых и слабокислых значениях pH окружающей его среды [38, 39]. Данное свойство имидазолат цинка делает его перспективным средством для таргетной доставки лекарственных средств [40–45]. В ряде работ описаны модификации композитов на основе МОКП специфическими компонентами, облегчающими связывание таких композитов с рецепторами целевых клеток, что дополнительно усиливает потенциал

данных носителей в качестве средств для адресной доставки терапевтических веществ [35, 46].

Задачей исследования послужила оценка эффективности биоминерализации геномной ДНК человека в модельный МОКП ZIF-8 с целью изучения возможности использования ZIF-8 для работы с нативными нуклеиновыми кислотами произвольного размера.

Материалы и методы

Химические реактивы. Были использованы 2-метилимидазол, *puriss* (Merck, Германия); ацетат цинка четырехводный, ос. ч. («Вектон», Россия); нитрат цинка шестиводный, ос. ч. («Вектон», Россия); деионизированная вода (уд. сопротивление — 17,8 МОм·см); иодид пропидия (неоФрох, Германия); лимонная кислота, ос. ч. («Вектон», Россия), цитрат натрия 3-замещенный 5,5-водный, «Вектон», Россия), агароза высокоочищенная (Acros Organics, США), краситель этидиум бромид (CDH, Индия).

Получение ZIF-8. Проанализировав методические подходы, позволяющие синтезировать ZIF-8 высокой степени кристалличности в физиологических условиях [47], мы выбрали несколько методик, выполняемых в водных растворах при температуре 37°C и отличающихся применением аниона соли цинка (т.е. использующих ацетат или нитрат цинка) и различным мольным соотношением металл:лиганд. В рамках предварительной работы был протестирован метод с соотношением реагентов ацетат цинка:2-метилимидазол:вода, равным 1:1:≥50, описанный в работе [48]. Несмотря на высокий выход МОКП (более 70%), полученный продукт представлял собой смесь кристаллических фаз, что было неприемлемо с точки зрения целей данной работы. Поэтому в экспериментах по исследованию характеристик полимера и его композита использовали три других мольных соотношения исходных компонентов нитрат цинка:2-метилимидазол:вода, а именно 1:15:≥2000; 1:40:≥2000 и 1:60:≥2000 [49]. Все эксперименты выполняли в десяти повторностях.

Получение и очистка нативной ДНК. Нативную геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови человека с использованием набора «Проба-НК» (НПО «ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя. Полученную ДНК хранили при –20°C. Перед включением в МОКП определяли чистоту и концентрацию ДНК путем измерения оптической плотности при длинах волн 260/280 нм на планшет-ридере Tecan Infinity 200 Pro (Tecan Instruments, Австрия) с использованием планшета NanoQuant (Tecan Instruments, Австрия).

Получение композита геномной ДНК@ZIF-8. К 800 мкл геномной ДНК в концентрациях 400 нг/мкл добавляли раствор нитрата цинка шестиводного (в концентрации 19,8 мг/мл), а затем вносили раствор 2-метилимидазола в концентрации 82 мг/мл в объеме 1,36 и 3,64 мл, 1 и 4 мл, что позволило получить

следующие мольные соотношения компонентов МОКП — 1:40 и 1:60 соответственно. Полученную взвесь встряхивали на вортексе в течение 1 мин и далее инкубировали в течение 1 сут при температуре 37°C. После инкубации образцы центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g, отделяли супернатант от преципитата, преципитат четырехкратно промывали деионизированной водой (5 мл) и высушивали при температуре 37°C.

Порошковая рентгеновская дифрактометрия. Образцы исследовали на порошковом рентгеновском дифрактометре Phaser D2 с 1D детектором LYNXEYE XE-T (Bruker, США). Диапазон углов отражений 2θ составлял 2–35°.

Определение удельной площади поверхности полимера по методу Брунауэра–Эммета–Теллера (БЭТ). Измерение проводили на порозиметре Autosorb iQ (Quantachrome, США) при относительном давлении p/p_0 $9 \cdot 10^{-3}$ –0,995 и температуре –196°C. Перед анализом образцы предварительно дегазировали в атмосфере гелия при температуре 60°C в течение 24 ч.

Количественная оценка геномной ДНК после биоминерализации. Раствор иодида пропидия добавляли в лунки 96-луночного черного плоскодонного планшета (SPL Life Sciences, Республика Корея), содержащие исследуемые образцы ДНК, из расчета 50 нг/лунку и общего объема раствора 200 мкл/лунку, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и считывали интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны излучения 617 нм на планшет-ридере Tecan Infinity 200 Pro (Tecan Instruments, Австрия). Калибровочную зависимость регистрировали в диапазоне концентраций ДНК 0–100 нг/мкл, установленных согласно измерениям оптической плотности раствора ДНК, при длине волны 260 нм на планшет-ридере Tecan Infinity 200 Pro с использованием планшета NanoQuant (Tecan Instruments, Австрия). Полученные зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации ДНК аппроксимировали линейной функцией $y = a \cdot x + b$, где a и b — константы, y — интенсивность флуоресценции, x — концентрация ДНК, и рассчитывали концентрации ДНК в образцах по формуле $x = (y - b) / a$. Расчеты выполняли в Microsoft Office Excel 2016.

Проведение ПЦР. Для оценки сохранения ДНК после биоминерализации в МОКП ZIF-8 выполняли ПЦР. Для растворения композита использовали цитратный буфер (0,1 М; pH=5,0), обеспечивающий полное растворение композита и сохранение целостности ДНК. После растворения композита ДНК очищали путем сорбции и промывки на магнитных частицах с использованием набора «НК-Экстра» («ТестГен», Россия).

Аллель-специфическую ПЦР (АС-ПЦР) выполняли двумя методами: в режиме реального времени на амплификаторе Quantstudio 6 Pro (Thermo Scientific, США) и с использованием электрофоретической детекции. Были выбраны однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphism, SNP) в сле-

дующих генах: *AGT* (rs4762), *APOC3* (rs5128), *APOE* (rs429358), *IL1 β* (rs1143627), *IL6* (rs1800795), *LIPC* (rs2070895), *LPL* (rs328), *MMP9* (rs11697325), *PON1* (rs662), *TNF- α* (rs1800629). Условия проведения ПЦР соответствовали указаниям в инструкции производителя наборов (НПФ «Литех», Россия). Электрофорез проводили в 3% агарозном геле с бромистым этидием в соответствии с рекомендациями производителя наборов (НПФ «Литех», Россия), фрагменты ДНК визуализировали с помощью системы гель-документирования «Взгляд» (НПФ «Хеликон», Россия). Данные SNP располагаются на 1, 2, 6, 7, 8, 11, 15, 19, 20-й хромосомах, что позволяет оценить неспецифическое сохранение целостности ДНК в пределах генома. В качестве контроля использовали нативную ДНК.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных выполняли в Microsoft Office Excel 2016 с надстройкой AtteStat 11.5. Проверку соответствия данных нормальному распределению осуществляли с использованием модифицированного критерия Колмогорова. Численные данные представлены в виде «среднее значение \pm стандартное отклонение». Коэффициент корреляции расчетных значений при оценке удельной площади поверхности автоматически рассчитывался встроенным программным обеспечением анализатора Quantachrome ASiQwin 5.21. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование ZIF-8. Полученные в ходе синтеза образцы анализировали на порошковом дифрактометре (рис. 1, а). Полученные дифрактограммы показывают, что образцы с мольным соотношением Zn^{2+} :лиганд=1:40 и 1:60 имеют характеристические пики отражений на углах 2θ , равных 8,0; 9,0; 10,5; 12,9; 14,9; 16,6; 18,2°, и представляют собой однофазные образцы ZIF-8 с *sod*-топологией и незначительной долей аморфной фазы. При этом на дифрактограмме образца с соотношением компонентов 1:15 присутствует множество дополнительных отражений, свидетельствующих о том, что данный образец представляет собой смесь фаз.

На следующем этапе выполняли измерение удельной площади поверхности полимера по методу БЭТ. Изотермы абсорбции N_2 показаны на рис. 1, б. В результате исследования установлено, что удельная площадь поверхности для образцов ZIF-8 с мольными соотношениями компонентов 1:15; 1:40 и 1:60 составила 7,0; 1570 ± 132 ; 1854 ± 173 м²/г соответственно. Коэффициент корреляции расчетных значений при использовании различных значений p/p_0 находился в диапазоне 0,984–0,999 при уровне значимости $p < 0,05$. Следует отметить, что ZIF-8, использованный для инкапсуляции микроРНК в работе [50], обладал аналогичной площадью поверхности (1301,4 м²/г). Данный показатель авторы указанной статьи считали доста-

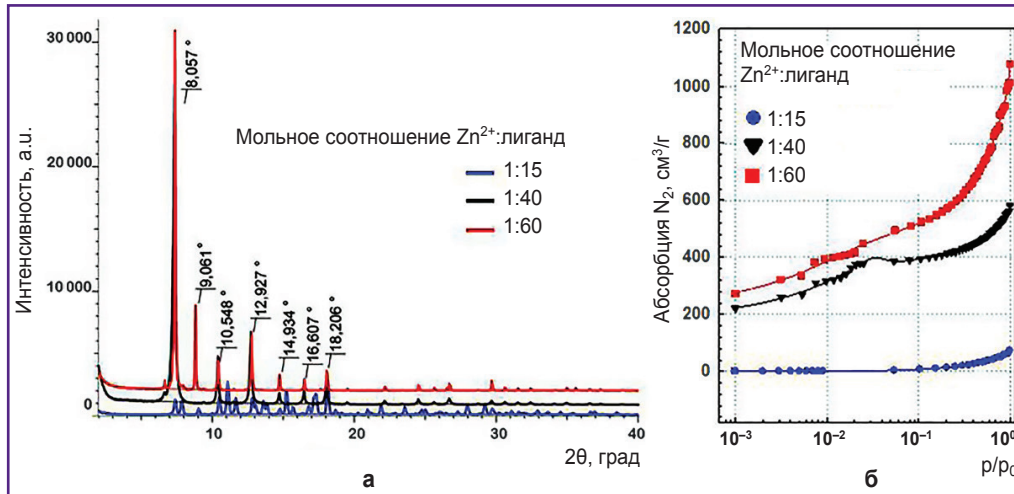


Рис. 1. Исследования образцов ZIF-8, полученных при различных мольных соотношениях «нитрат цинка:2-метилимидазол»:

а — типичные дифрактограммы; б — типичные изотермы абсорбции N_2

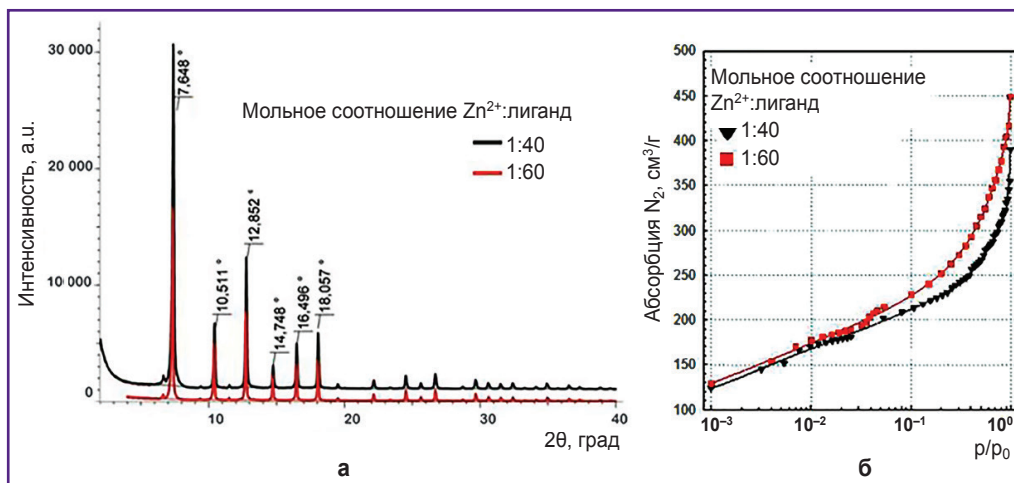


Рис. 2. Исследования образцов композитов ДНК@ZIF-8, полученных при различных мольных соотношениях «нитрат цинка:2-метилимидазол»:

а — типичные дифрактограммы; б — типичные изотермы абсорбции N_2

точно высоким, способным обеспечить эффективное включение больших количеств полезной нагрузки (до 36 мкг/мг полимера). Вместе с тем для инкапсуляции низкомолекулярных соединений, например доксицилина, может быть достаточно удельной площади поверхности порядка $75 \text{ м}^2/\text{г}$ [51].

Таким образом, эксперимент показал, что образец с мольным соотношением компонентов 1:15 характеризуется низкой удельной площадью поверхности. Минерализация ДНК в таких условиях малоэффективна. Вместе с тем удельная площадь поверхности двух других образцов сопоставима и достаточна для выполнения экспериментов по инкапсуляции ДНК, поэтому на следующем этапе нативную ДНК подвергали минерализации при мольных соотношениях исходных компонентов МОКП, равных 1:40 и 1:60.

Исследование композита ДНК@ZIF-8. Композиты ДНК@ZIF-8, получаемые согласно приведенному описанию, анализировали на порошковом дифрактометре (рис. 2, а). Данные дифрактометрии показывают, что синтезированные композиты имеют характеристические пики отражений на углах 2θ , равных 7,6; 10,5; 12,8; 14,7; 16,5; 18,0°, и представляют собой однофазные образцы ZIF-8, соответствующие данным литературы [48, 49].

Исследование удельной площади поверхности композитов выполняли в тех же условиях, что и ZIF-8 без ДНК. Изотермы абсорбции представлены на рис. 2, б. Результаты исследования показали, что удельная площадь поверхности для образцов композитов ДНК@ZIF-8 с мольным соотношением компонентов 1:40 и 1:60 составляет 524 ± 54 и $715 \pm 74 \text{ м}^2/\text{г}$ соответственно.

**Удельная площадь поверхности ZIF-8
и композита ДНК@ZIF-8**

Мольные соотношения	Площадь поверхности ZIF-8, м ² /г	Площадь поверхности ДНК@ZIF-8, м ² /г
1:40	1570±132	523±54
1:60	1854±173	715±74

Коэффициент корреляции расчетных значений при использовании различных значений r/p_0 равняется 0,999 при уровне значимости $p < 0,05$.

Таким образом, для композита ДНК@ZIF-8 наблюдается значительное уменьшение удельной площади поверхности по сравнению с чистым ZIF-8 (см. таблицу). Данный факт может объясняться включением геномной ДНК в структуру МОКП и блокированием доступа газа к порам.

Далее сухой композит ДНК@ZIF-8 растворяли в цитратном буфере (0,1 М; pH=5,0) объемом 1,6 мл и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. После растворения повторно измеряли концентрацию ДНК с применением раствора йодида пропидия. Использование ДНК-метрии с йодидом пропидия в данном случае было связано с тем, что лиганд используемого МОКП — 2-метилимидазол, находящийся в избытке по отношению к ДНК, характеризуется частичным поглощением спектра в области 240–280 нм. Это делало невозможным использование спектрофотометрии 260/280 нм для количественной оценки ДНК в образцах в данном эксперименте [52].

Эффективность включения ДНК в МОКП рассчитывали следующим образом:

$$X = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1 \cdot V_1} \cdot 100\%$$

где C_1 — концентрация ДНК до включения в МОКП;

V_1 — объем ДНК до включения в МОКП; C_2 — концентрация ДНК после растворения композита; V_2 — объем раствора композита в цитратном буфере.

Эффективность включения геномной ДНК в ZIF-8 для образцов с соотношением исходных компонентов 1:40 и 1:60 составила $8,58 \pm 1,50$ и $7,94 \pm 1,25\%$ соответственно, причем значимых различий эффективности включения в зависимости от мольного соотношения компонентов МОКП не выявлено ($p > 0,05$). Следует отметить, что в работах других авторов [20, 50, 53, 54] достигались на порядок более высокие значения эффективности минерализации плазмидной ДНК (46–82%) и микроРНК (61–72%), а в работе [51] продемонстрирована еще более высокая (до 90%) эффективность загрузки комплексов ДНК/РНК, достигавшаяся за счет того, что нуклеиновые кислоты подвергали не инкапсуляции, а электростатическому связыванию с поверхностью частиц композита железосодержащего МОКП и доксицилина. Можно предположить, что сравнительно низкая степень биоминерализации ДНК в настоящем исследовании обусловлена конкурентными процессами, идущими одновременно с собственно биоминерализацией ДНК и вносящими помехи в ее ход. К таким процессам относятся, во-первых, процесс самостоятельной полимеризации ZIF-8 и, во-вторых, процессы нуклеации ZIF-8 вокруг низкомолекулярных соединений, находящихся в исследуемых образцах, с последующей их инкапсуляцией. Кроме того, молекулы плазмидной ДНК или микроРНК характеризуются многократно меньшими размерами и массой по сравнению с полноразмерной хромосомной ДНК человека, что, очевидно, облегчает их встраивание в МОКП-структуру.

По результатам АС-ПЦР в режиме реального времени для нативной ДНК были получены кривые амплификации, соответствующие наличию генотипа СС для полиморфизма rs4762 (рис. 3), СG — для rs5128,

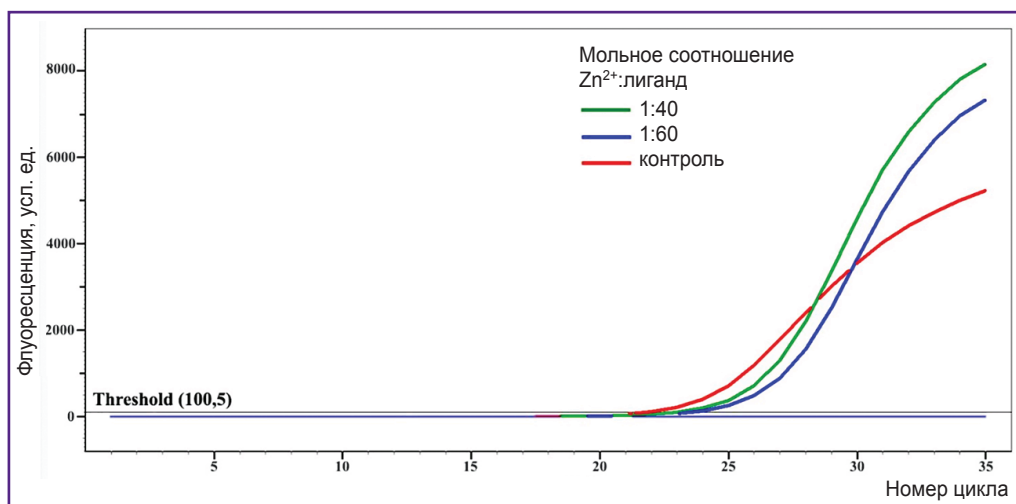


Рис. 3. График амплификации SNP rs4762 после биоминерализации и растворения композитов ДНК@ZIF-8 в цитратном буфере
Пороговый цикл Ct равен 21,5 (контроль); 23,1 (мольное соотношение 1:40); 23,8 (мольное соотношение 1:60)

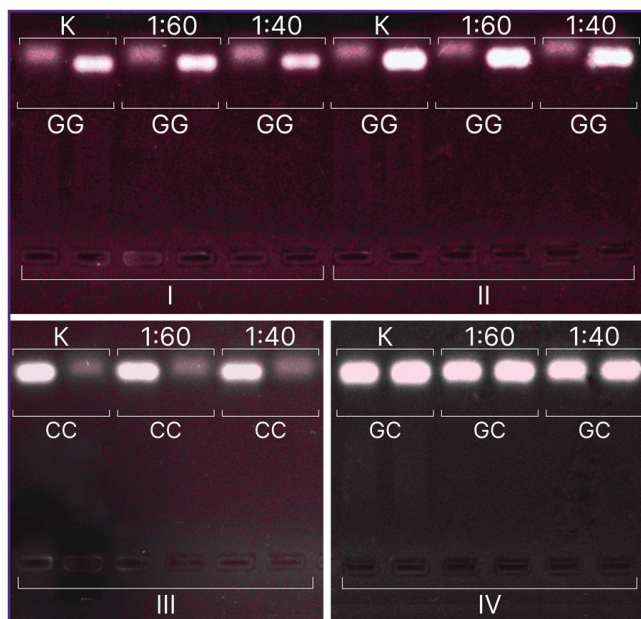


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР в 1,5% агарозном геле:

К — контроль; 1:40, 1:60 — мольное соотношение Zn^{2+} :лиганд; I — ген *MMP9* (8202 G>A, rs11697325); II — ген *TNF-α* (308 G>A, rs1800629); III — ген *IL1β* (31 T>C, rs1143627); IV — ген *IL6* (174 G>C, rs1800795)

TC — для rs429358, AG — для rs2070895, CC — для rs328, GG — для rs662, а в случае электрофоретической детекции — следующие результаты: генотип GG — для rs1800629, GG — для rs11697325, CC — для rs1143627, GC — для rs1800795 (рис. 4). После растворения композитов ДНК@ZIF-8 (мольное соотношение компонентов 1:40 и 1:60) и проведения ПЦР результаты соответствовали генотипу нативной ДНК во всех исследуемых образцах. Результаты АС-ПЦР подтверждают присутствие произвольно выбранных областей ДНК в пределах генома в образцах после их биоминерализации в ZIF-8. Это косвенно указывает на сохранение значительной части геномной ДНК в процессе инкапсуляции и разрушения МОКП, а также на способность ZIF-8 к включению инкапсулированных последовательностей ДНК большого размера. В дальнейшем такие последовательности можно использовать в исследованиях по изучению и формированию генетических конструкций, в частности векторов, зондов, компонентов систем редактирования генов, генотерапевтических средств и т.д.

Осуществление инкапсуляции геномной ДНК в ZIF-8 выделяет данную работу среди уже опубликованных аналогов, в которых инкапсуляции подвергали фрагменты нуклеиновых кислот фиксированного размера [35–37, 55–57]. Подтверждение возможности инкапсуляции геномной ДНК посредством ПЦР геномных локусов, локализованных на различных хромосомах, делает данный подход весьма перспективным с

точки зрения разработки абиотических векторов для доставки генетического материала. В частности, такая возможность инкапсуляции нуклеиновых кислот большого размера расширяет потенциал технологии рекомбинантных ДНК, снимая ограничения по размеру включаемой полезной нагрузки, характерные для плазмидных, космидных и вирусных векторов. При этом относительно низкая эффективность минерализации геномной ДНК не является препятствием для дальнейшего отбора целевых локусов из сохраненной геномной ДНК, их клонирования, модификации и прочих операций, сопровождающих разработку рекомбинантных последовательностей [32]. Кроме того, использование данного нетоксичного МОКП в качестве носителя может позволить «смягчить» решение проблемы со стабильностью, токсичностью и иммуногенностью, что свойственно другим абиотическим векторам. Таким образом, полученные результаты имеют важное значение для дальнейшего развития методологии исследований в области молекулярной генетики и геной инженерии.

Заключение

Продемонстрирована возможность биоминерализации нативной ДНК человека в модельный МОКП ZIF-8. Подобраны оптимальные мольные соотношения компонентов МОКП (Zn^{2+} :2-метилимидазол) для биоминерализации ДНК. Исследование композитов ДНК@ZIF-8 методом порошковой рентгеновской дифрактометрии показало, что ДНК не влияет на структуру кристаллов 2-метилимидазолатата цинка. Методом порозиметрии продемонстрировано трехкратное падение площади поверхности композита по сравнению с чистым МОКП, что, по всей вероятности, обусловлено включением ДНК. Установлено, что при мольных соотношениях компонентов 1:40 и 1:60 эффективность инкапсуляции геномной ДНК составила $8,58 \pm 1,50$ и $7,94 \pm 1,25\%$ соответственно, что обеспечивает сохранение ДНК в количествах, достаточных для дальнейших манипуляций. Значимых различий между данными мольными соотношениями не выявлено. Выполненный ПЦР-анализ произвольных локусов ДНК после биоминерализации и растворения композитов продемонстрировал их сохранение.

Полученные результаты указывают на перспективность используемого подхода для разработки векторов доставки нуклеиновых кислот произвольного размера и обосновывают целесообразность дальнейших работ в данном направлении.

Финансирование исследования. Работа выполнена за счет бюджетных средств в рамках Государственного задания, рег. номер 122020100109-6, в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликтов интересов.

Литература/References

- Gardlik R., Pálffy R., Hodosy J., Lukács J., Turna J., Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 2005; 11(4): RA110–RA121.
- Flitsch L.J., Börner K., Stüllein C., Ziegler S., Sonntag-Buck V., Wiedtke E., Semkova V., Au Yeung S.W.C., Schlee J., Hajo M., Mathews M., Ludwig B.S., Kossatz S., Kessler H., Grimm D., Brüstle O. Identification of adeno-associated virus variants for gene transfer into human neural cell types by parallel capsid screening. *Sci Rep* 2022; 12(1): 8356, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12404-0>.
- Franceschi R.T., Ge C. Gene delivery by adenoviruses. In: *Methods in molecular biology. Osteoporosis: methods and protocols*. Westendorf J.J. (editor). Totowa, NJ: Humana Press; 2008; p. 137–147.
- George L.A., Monahan P.E., Eyster M.E., Sullivan S.K., Ragni M.V., Croteau S.E., Rasko J.E.J., Recht M., Samelson-Jones B.J., MacDougall A., Jaworski K., Noble R., Curran M., Kuranda K., Mingozzi F., Chang T., Reape K.Z., Anguela X.M., High K.A. Multiyear factor VIII expression after AAV gene transfer for hemophilia A. *N Engl J Med* 2021; 385(21): 1961–1973, <https://doi.org/10.1056/nejmoa2104205>.
- Kohn D.B., Booth C., Kang E.M., Pai S.Y., Shaw K.L., Santilli G., Armant M., Buckland K.F., Choi U., De Ravin S.S., Dorsey M.J., Kuo C.Y., Leon-Rico D., Rivat C., Izotova N., Gilmour K., Snell K., Dip J.X., Darwish J., Morris E.C., Terrazas D., Wang L.D., Bauser C.A., Paprotka T., Kuhns D.B., Gregg J., Raymond H.E., Everett J.K., Honnet G., Biasco L., Newburger P.E., Bushman F.D., Grez M., Gaspar H.B., Williams D.A., Malech H.L., Galy A., Thrasher A.J.; Net4CGD consortium. Lentiviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease. *Nat Med* 2020; 26(2): 200–206, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0735-5>.
- Martinez-Navio J.M., Fuchs S.P., Pantry S.N., Lauer W.A., Duggan N.N., Keele B.F., Rakasz E.G., Gao G., Lifson J.D., Desrosiers R.C. Adeno-associated virus delivery of anti-HIV monoclonal antibodies can drive long-term virologic suppression. *Immunity* 2019; 50(3): 567–75.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.02.005>.
- Pavlou M., Schön C., Ocelli L.M., Rossi A., Meumann N., Boyd R.F., Bartoe J.T., Siedlecki J., Gerhardt M.J., Babutzka S., Bogedein J., Wagner J.E., Priglinger S.G., Biel M., Petersen-Jones S.M., Büning H., Michalakakis S. Novel AAV capsids for intravitreal gene therapy of photoreceptor disorders. *EMBO Mol Med* 2021; 13(4): e13392, <https://doi.org/10.15252/emmm.202013392>.
- Tolmachov O. Designing plasmid vectors. In: *Methods in molecular biology. Gene therapy of cancer: methods and protocols*. Walther W., Stein U.S. (editors). Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 117–129.
- Hanlon K.S., Kleinstiver B.P., Garcia S.P., Zaborowski M.P., Volak A., Spirig S.E., Muller A., Sousa A.A., Tsai S.Q., Bengtsson N.E., Lööv C., Ingelsson M., Chamberlain J.S., Corey D.P., Aryee M.J., Joung J.K., Breakefield X.O., Maguire C.A., György B. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun* 2019; 10(1): 4439, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12449-2>.
- Basinska T., Gadzinowski M., Mickiewicz D., Slomkowski S. Functionalized particles designed for targeted delivery. *Polymers (Basel)* 2021; 13(12): 2022, <https://doi.org/10.3390/polym13122022>.
- Eygeris Y., Gupta M., Kim J., Sahay G. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Acc Chem Res* 2022; 55(1): 2–12, <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00544>.
- Mintzer M.A., Simanek E.E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev* 2009; 109(2): 259–302, <https://doi.org/10.1021/cr800409e>.
- Zhu H., Zhang L., Tong S., Lee C.M., Deshmukh H., Bao G. Spatial control of in vivo CRISPR-Cas9 genome editing via nanomagnets. *Nat Biomed Eng* 2019; 3(2): 126–136, <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0318-7>.
- Feng Q., Liu Y., Huang J., Chen K., Huang J., Xiao K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Sci Rep* 2018; 8(1): 2082, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19628-z>.
- Maier M.A., Jayaraman M., Matsuda S., Liu J., Barros S., Querbes W., Tam Y.K., Ansell S.M., Kumar V., Qin J., Zhang X., Wang Q., Panesar S., Hutabarat R., Carioto M., Hettlinger J., Kandasamy P., Butler D., Rajeev K.G., Pang B., Charisse K., Fitzgerald K., Mui B.L., Du X., Cullis P., Madden T.D., Hope M.J., Manoharan M., Akinc A. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther* 2013; 21(8): 1570–1578, <https://doi.org/10.1038/mt.2013.124>.
- Schultheis B., Strumberg D., Kuhlmann J., Wolf M., Link K., Seufferlein T., Kaufmann J., Feist M., Gebhardt F., Khan M., Stintzing S., Pelzer U. Safety, efficacy and pharmacokinetics of targeted therapy with the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 combined with gemcitabine in patients with pancreatic adenocarcinoma. A randomized phase Ib/IIa study. *Cancers (Basel)* 2020; 12(11): 3130, <https://doi.org/10.3390/cancers12113130>.
- Yadav S., Sharma A.K., Kumar P. Nanoscale self-assembly for therapeutic delivery. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 127, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00127>.
- Yan Y., Liu X.Y., Lu A., Wang X.Y., Jiang L.X., Wang J.C. Non-viral vectors for RNA delivery. *J Control Release* 2022; 342: 241–279, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.008>.
- Rui Y., Wilson D.R., Choi J., Varanasi M., Sanders K., Karlsson J., Lim M., Green J.J. Carboxylated branched poly(β -amino ester) nanoparticles enable robust cytosolic protein delivery and CRISPR-Cas9 gene editing. *Sci Adv* 2019; 5(12): eaay3255, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay3255>.
- Poddar A., Conesa J.J., Liang K., Dhakal S., Reineck P., Bryant G., Pereiro E., Ricco R., Amenitsch H., Doonan C., Mulet X., Doherty C.M., Falcaro P., Shukla R. Encapsulation, visualization and expression of genes with biomimetically mineralized zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8). *Small* 2019; 15(36): e1902268, <https://doi.org/10.1002/smll.201902268>.
- Jia J., Zhang S., Wen K., Li Q. Nano-scaled zeolitic imidazole framework-8 as an efficient carrier for the intracellular delivery of RNase A in cancer treatment. *Int J Nanomedicine* 2019; 14: 9971–9981, <https://doi.org/10.2147/ijn.s210107>.
- Teplensky M.H., Fantham M., Poudel C., Hockings C., Lu M., Guna A., Aragones-Anglada M., Moghadam P.Z., Li P., Farha O.K., Bernaldo de Quirós Fernández S., Richards F.M., Jodrell D.I., Kaminski Schierle G., Kaminski C.F., Fairen-Jimenez D. A highly porous metal-organic framework system to deliver payloads for gene knockdown. *Chem* 2019; 5(11): 2926–2941, <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.08.015>.
- Shi L., Wu J., Qiao X., Ha Y., Li Y., Peng C., Wu R. In

situ biomimetic mineralization on ZIF-8 for smart drug delivery. *ACS Biomater Sci Eng* 2020; 6(8): 4595–4603, <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.0c00935>.

24. Zhang Y., Lai L., Liu Y., Chen B., Yao J., Zheng P., Pan Q., Zhu W. Biomimetic cascade enzyme-encapsulated ZIF-8 nanoparticles combined with antisense oligonucleotides for drug-resistant bacteria treatment. *ACS Appl Mater Interfaces* 2022; 14(5): 6453–6464, <https://doi.org/10.1021/acscami.1c23808>.

25. Abdelhamid H.N., Dowaidar M., Langel Ü. Carbonized chitosan encapsulated hierarchical porous zeolitic imidazolate frameworks nanoparticles for gene delivery. *Microporous Mesoporous Mater* 2020; 302: 110200, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110200>.

26. Khalilian S.F., Tohidi M., Rastegari B. Synthesis of a biocompatible nanoporous zeolitic imidazolate framework-8 in the presence of Gum Arabic inspired by the biomimetic mineralization process. *Cryst Eng Comm* 2020; 22(10): 1875–1884, <https://doi.org/10.1039/c9ce01915d>.

27. Ren L., Xiao X., Chen Y., Yu Y., Zhang Q., Liu R., Xu W. Preparation of ZIF-8/natural plant fiber composites via biomimetic mineralization for highly efficient removal of formaldehyde. *ChemistrySelect* 2019; 4(42): 12294–12303, <https://doi.org/10.1002/slct.201903234>.

28. Velásquez-Hernández M.J., Astria E., Winkler S., Liang W., Wiltsche H., Poddar A., Shukla R., Prestwich G., Paderi J., Salcedo-Abraira P., Amenitsch H., Horcajada P., Doonan C.J., Falcaro P. Modulation of metal-azolate frameworks for the tunable release of encapsulated glycosaminoglycans. *Chem Sci* 2020; 11(39): 10835–10843, <https://doi.org/10.1039/d0sc01204a>.

29. Li S., Dharmawardana M., Welch R.P., Ren Y., Thompson C.M., Smaldone R.A., Gassensmith J.J. Template-directed synthesis of porous and protective core-shell bionanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016; 55(36): 10691–10696, <https://doi.org/10.1002/anie.201604879>.

30. Liang K., Richardson J.J., Cui J., Caruso F., Doonan C.J., Falcaro P. Metal-organic framework coatings as cytoprotective exoskeletons for living cells. *Adv Mater* 2016; 28(36): 7910–7914, <https://doi.org/10.1002/adma.201602335>.

31. Liang K., Richardson J.J., Doonan C.J., Mulet X., Ju Y., Cui J., Caruso F., Falcaro P. An enzyme-coated metal-organic framework shell for synthetically adaptive cell survival. *Angewandte chemie international edition. Angew Chem Int Ed Engl* 2017; 56(29): 8510–8515, <https://doi.org/10.1002/anie.201704120>.

32. Li Y., Zhang K., Liu P., Chen M., Zhong Y., Ye Q., Wei M.Q., Zhao H., Tang Z. Encapsulation of plasmid DNA by nanoscale metal-organic frameworks for efficient gene transportation and expression. *Adv Mater* 2019; 31(29): e1901570, <https://doi.org/10.1002/adma.201901570>.

33. Polash S.A., Garlick-Trease K., Pyreddy S., Periasamy S., Bryant G., Shukla R. Amino acid-coated zeolitic imidazolate framework for delivery of genetic material in prostate cancer cell. *Molecules* 2023; 28(12): 4875, <https://doi.org/10.3390/molecules28124875>.

34. Alyami M.Z., Alsaiari S.K., Li Y., Qutub S.S., Aleisa F.A., Sougrat R., Merzaban J.S., Khashab N.M. Cell-type-specific CRISPR/Cas9 delivery by biomimetic metal organic frameworks. *J Am Chem Soc* 2020; 142(4): 1715–1720, <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11638>.

35. Alsaiari S.K., Patil S., Alyami M., Alamoudi K.O.,

Aleisa F.A., Merzaban J.S., Li M., Khashab N.M. Endosomal escape and delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery enabled by nanoscale zeolitic imidazolate framework. *J Am Chem Soc* 2018; 140(1): 143–146, <https://doi.org/10.1021/jacs.7b11754>.

36. Liu C., Xu X., Koivisto O., Zhou W., Jacquemet G., Rosenholm J.M., Zhang H. Improving the knock-in efficiency of the MOF-encapsulated CRISPR/Cas9 system through controllable embedding structures. *Nanoscale* 2021; 13(39): 16525–16532, <https://doi.org/10.1039/d1nr02872c>.

37. Poddar A., Pyreddy S., Carraro F., Dhakal S., Russell A., Field M.R., Reddy T.S., Falcaro P., Doherty C.M., Shukla R. ZIF-C for targeted RNA interference and CRISPR/Cas9 based gene editing in prostate cancer. *Chem Commun (Camb)* 2020; 56(98): 15406–15409, <https://doi.org/10.1039/d0cc06241c>.

38. Lu G., Li S., Guo Z., Farha O.K., Hauser B.G., Qi X., Wang Y., Wang X., Han S., Liu X., DuChene J.S., Zhang H., Zhang Q., Chen X., Ma J., Loo S.C., Wei W.D., Yang Y., Hupp J.T., Huo F. Imparting functionality to a metal-organic framework material by controlled nanoparticle encapsulation. *Nat Chem* 2012; 4(4): 310–316, <https://doi.org/10.1038/nchem.1272>.

39. Venna S.R., Jasinski J.B., Carreon M.A. Structural evolution of zeolitic imidazolate framework-8. *J Am Chem Soc* 2010; 132(51): 18030–18033, <https://doi.org/10.1021/ja109268m>.

40. Bi J., Lu Y., Dong Y., Gao P. Synthesis of folic acid-modified DOX@ZIF-8 nanoparticles for targeted therapy of liver cancer. *J Nanomater* 2018; 2018: 1357812, <https://doi.org/10.1155/2018/1357812>.

41. Yan J., Liu C., Wu Q., Zhou J., Xu X., Zhang L., Wang D., Yang F., Zhang H. Mineralization of pH-sensitive doxorubicin prodrug in ZIF-8 to enable targeted delivery to solid tumors. *Anal Chem* 2020; 92(16): 11453–11461, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02599>.

42. Zeyni V., Karimi S., Namazi H. Surface PEGylation of ZIF-8 metal-organic framework based on magnetic hydroxyapatite as a pH/magnetic targeting responsive system for anticancer drug delivery. *Microporous Mesoporous Mater* 2023; 354: 112544, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2023.112544>.

43. Reshmi R., Jiju K.R., Suma S., Nair A.S. Folic acid grafted aminated zeolitic imidazolate framework (ZIF-8) as pH responsive drug carrier for targeted delivery of curcumin. *J Drug Deliv Sci Technol* 2023; 79: 104098, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104098>.

44. Fang J., Yang Y., Xiao W., Zheng B., Lv Y.B., Liu X.L., Ding J. Extremely low frequency alternating magnetic field-triggered and MRI-traced drug delivery by optimized magnetic zeolitic imidazolate framework-90 nanoparticles. *Nanoscale* 2016; 8(6): 3259–3263, <https://doi.org/10.1039/c5nr08086j>.

45. Shi Z., Chen X., Zhang L., Ding S., Wang X., Lei Q., Fang W. FA-PEG decorated MOF nanoparticles as a targeted drug delivery system for controlled release of an autophagy inhibitor. *Biomater Sci* 2018; 6(10): 2582–2590, <https://doi.org/10.1039/c8bm00625c>.

46. Wang Y., Shahi P.K., Xie R., Zhang H., Abdeen A.A., Yodsanit N., Ma Z., Saha K., Pattnaik B.R., Gong S. A pH-responsive silica-metal-organic framework hybrid nanoparticle for the delivery of hydrophilic drugs, nucleic acids, and CRISPR-Cas9 genome-editing machineries. *J Control Release* 2020; 324: 194–203, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.052>.

47. Wang S., Ouyang L., Deng G., Deng Z., Wang S. DNA adsorption on nanoscale zeolitic imidazolate framework-8 enabling rational design of a DNA-based nanoprobe for gene detection and regulation in living cells. *RSC Adv* 2020; 10(51): 31012–31021, <https://doi.org/10.1039/d0ra06218a>.
48. Zhang H., James J., Zhao M., Yao Y., Zhang Y., Zhang B., Lin Y.S. Improving hydrostability of ZIF-8 membranes via surface ligand exchange. *J Membr Sci* 2017; 532: 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.01.065>.
49. Kida K., Okita M., Fujita K., Tanaka S., Miyake Y. Formation of high crystalline ZIF-8 in an aqueous solution. *CrystEngComm* 2013; 15(9): 1794–1801, <https://doi.org/10.1039/c2ce26847g>.
50. Zhao H., Li T., Yao C., Gu Z., Liu C., Li J., Yang D. Dual roles of metal–organic frameworks as nanocarriers for miRNA delivery and adjuvants for chemodynamic therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2021; 13(5): 6034–6042, <https://doi.org/10.1021/acsami.0c21006>.
51. Huang C., Tan W., Zheng J., Zhu C., Huo J, Yang R. Azoreductase-responsive metal–organic framework-based nanodrug for enhanced cancer therapy via breaking hypoxia-induced chemoresistance. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019; 11(29): 25740–25749, <https://doi.org/10.1021/acsami.9b08115>.
52. Sorrell T.N., Borovik A.S. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of an unusual copper(I) dimer having imidazole ligands. A model for the carbonyl derivative of hemocyanin and implications for the structure of deoxyhemocyanin. *J Am Chem Soc* 1987; 109(14): 4255–4260, <https://doi.org/10.1021/ja00248a020>.
53. Yang X., Tang Q., Jiang Y., Zhang M., Wang M., Mao L. Nanoscale ATP-responsive zeolitic imidazole framework-90 as a general platform for cytosolic protein delivery and genome editing. *J Am Chem Soc* 2019; 141(9): 3782–3786, <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11996>.
54. Mokri N., Sepehri Z., Faninam F., Khaleghi S., Kazemi N.M., Hashemi M. Chitosan-coated Zn-metal-organic framework nanocomposites for effective targeted delivery of LNA-antisense miR-224 to colon tumor: in vitro studies. *Gene Ther* 2022; 29(12): 680–690, <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00265-7>.
55. Rabiee N., Bagherzadeh M., Jouyandeh M., Zarrintaj P., Saeb M.R., Mozafari M., Shokouhimehr M., Varma R.S. Natural polymers decorated MOF-MXene nanocarriers for co-delivery of doxorubicin/pCRISPR. *ACS Appl Bio Mater* 2021; 4(6): 5106–5121, <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00332>.
56. Zheng Q., Li W., Mao L., Wang M. Nanoscale metal–organic frameworks for the intracellular delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery. *Biomater Sci* 2021; 9(21): 7024–7033, <https://doi.org/10.1039/d1bm00790d>.
57. Chen Q., Xu M., Zheng W., Xu T., Deng H., Liu J. Se/Ru-decorated porous metal–organic framework nanoparticles for the delivery of pooled siRNAs to reversing multidrug resistance in taxol-resistant breast cancer cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017; 9(8): 6712–6724, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b12792>.